

14. 7. 2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 7月11日

出願番号  
Application Number: 特願2003-273430  
[ST. 10/C]: [JP2003-273430]

REC'D 02 SEP 2004

WIPO

PCT

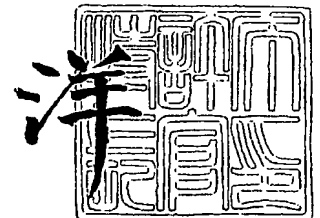
出願人  
Applicant(s): 太陽誘電株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 8月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 JP03-0028  
【提出日】 平成15年 7月11日  
【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 群馬県高崎市栄町 8 番 1 号 太陽誘電株式会社内  
    【氏名】 萩原 直人  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000204284  
    【氏名又は名称】 太陽誘電株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100086689  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 松井 茂  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 002071  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 0217666

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

一の流路内を、少なくともテンプレートとなる核酸と、プライマーとなる核酸と、リン酸化合物及び金属イオンを含む反応液を移動させることにより DNA の増幅を行う DNA 増幅装置であって、

前記流路は、二重鎖を形成した前記テンプレートとなる核酸を変性させて一本鎖にする変性反応を行う変性領域と、一本鎖にした前記テンプレートとなる核酸と前記プライマーとなる核酸とのアニーリング反応を行うと共に核酸合成酵素によって DNA 合成反応を行う再生領域とを有し、前記再生領域には核酸合成酵素が固定されていることを特徴とする DNA 増幅装置。

**【請求項 2】**

前記変性領域は加熱手段を備え、前記再生領域は冷却手段を備えている請求項 1 に記載の DNA 増幅装置。

**【請求項 3】**

前記核酸合成酵素は、前記再生領域内に充填されたビーズに固定されている請求項 1 又は 2 に記載の DNA 増幅装置。

**【請求項 4】**

前記核酸合成酵素は、前記変性領域と再生領域を含む流路の内壁面に固定されている請求項 1 又は 2 に記載の DNA 増幅装置。

**【請求項 5】**

前記流路内に、前記変性領域と前記再生領域が交互に複数設けられている請求項 1 ～ 4 のいずれか一つに記載の DNA 増幅装置。

**【請求項 6】**

前記反応液は、少なくとも前記テンプレートとなる核酸を含む第 1 反応液と、少なくとも前記プライマーとなる核酸と、リン酸化合物及び金属イオンを含む第 2 反応液とからなり、前記第 1 反応液を前記流路内に送液する手段と、前記第 2 反応液を前記流路内に送液する手段とを独立して具備し、

前記変性領域及び前記再生領域を通過した反応液を、前記第 1 反応液として再利用するための流路が設けられている請求項 1 ～ 5 のいずれか一つに記載の DNA 増幅装置。

**【請求項 7】**

二重鎖を形成した核酸を変性させて一本鎖にする変性反応を行う変性領域と、一本鎖にした前記核酸とプライマーとなる核酸とのアニーリング反応を行うと共に核酸合成酵素によって DNA 合成反応を行う再生領域とを有する一の流路に、少なくともテンプレートとなる核酸と、プライマーとなる核酸と、リン酸化合物及び金属イオンを含む反応液を送液し、前記変性領域で、前記テンプレートとなる核酸を一本鎖にする変性反応を行い、次いで、前記再生領域で、一本鎖にした前記テンプレートとなる核酸と前記プライマーとなる核酸とのアニーリング反応を行うと共に該再生領域内に固定された核酸合成酵素によって DNA 合成を行うことを特徴とする DNA 増幅方法。

## 【書類名】明細書

## 【発明の名称】DNA増幅装置及びDNA増幅方法

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、PCR法を利用したDNA増幅装置及びDNA増幅方法に関し、更に詳しくは、一の流路内を、少なくともテンプレートとなる核酸と、プライマーとなる核酸と、リン酸化合物及び金属イオンを含む反応液を移動させ、該流路内に固定された核酸合成酵素によりDNAの増幅を行うDNA増幅装置及びDNA増幅方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

微量のテンプレートDNAの効率的な複製・増幅には、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法が広く用いられている。PCR法は、テンプレートとなる2本鎖DNAを熱変性して1本鎖DNAにする工程、得られた1本鎖テンプレートDNAに各々相補的なプライマーをアニーリングする工程、耐熱性を有するDNAポリメラーゼを作用させて、プライマーから相補鎖合成を行うことにより2本鎖DNAを合成する工程を1サイクルとし、このサイクルを複数回繰り返すことによって目的のDNAを増幅する方法である。

## 【0003】

上記各工程は、反応液の温度及び反応時間を管理することにより行われており、通常、テンプレートとなる2本鎖DNAの1本鎖DNAへの熱変性は約94℃、1本鎖DNAへのプライマーのアニーリングは約55℃、DNAポリメラーゼによる相補鎖の合成は約72℃で行われる。

## 【0004】

従来、PCR法を自動的に行う装置として、テンプレートDNA、プライマー、dNTP、DNAポリメラーゼ等を含む反応液をエッペンドルフ型チューブに入れ、このチューブをアルミ製のブロックに設けられたウェルに挿入して該アルミブロックの温度をヒーターと冷却器を用いて変化させることにより反応を行う装置が知られている。

## 【0005】

しかしながら、上記PCR法は熱サイクルを高い精度の温度コントロール下で行う必要があり、上記のようなバッチ式での反応ではスケールの増大とともに反応系の熱揺らぎが著しくなるためスケールアップに限界があった。

## 【0006】

そのため、熱サイクルの温度コントロールを高い精度で行い、かつスケールアップも可能なPCR法として、下記特許文献1及び下記非特許文献1には、フロー式PCR法が開示されている。このフロー式PCR法は、加熱部と冷却部を設けた流路に、DNAポリメラーゼ、鋳型DNA、プライマーDNA、dNTP等を含む反応液を送液することによって熱サイクルを行い、PCRを行う方法である。

## 【0007】

また、下記特許文献2には、核酸配列を増幅するための方法であって、(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの3'末端又は3'末端側に配置され；(b) (a)工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および(c) (b)工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法が開示されている。この方法(ICAN法)によれば、熱サイクルを行わずにDNAを増幅することができるので、耐熱性のない酵素を用いることができ、また、熱揺らぎによる反応スケールの制限もない。

【特許文献1】特開平6-30776号公報

【特許文献2】特開2003-70490号公報

【非特許文献1】「Science」(1998年)280号5366巻、1046-1048頁(Kopp MU、Melio AJ、Manz A. 著)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、上記バッチ式のPCR法、上記特許文献1や上記非特許文献1に記載されたPCR法は、2本鎖テンプレートDNAを1本鎖DNAに変性させる際に加熱する必要があるため、耐熱性を有する特殊なDNAポリメラーゼを用いる必要があり、普遍的に存在する耐熱性のないDNAポリメラーゼが使用できないという欠点があった。

【0009】

また、上記特許文献2に開示された方法では、プライマーにRNAとDNAのキメラプライマーを用いたり、DNAの二重鎖をほどこしながらDNAを合成するexo-Bca DNA polymeraseやキメラプライマーから新たに伸長されたDNAとキメラプライマーRNAとの接点を切断するRNase H等の特殊な酵素を必要とするため、コストが高くなってしまいうという欠点があった。

【0010】

更に、上記従来の方法では、反応生成物中にDNAポリメラーゼ等の核酸合成酵素が混在するため、増幅したDNAの精製に手間がかかるだけでなく、高価な核酸合成酵素の再利用がほとんど不可能であった。

【0011】

したがって、本発明の目的は、耐熱性を有する核酸合成酵素だけでなく耐熱性のない核酸合成酵素を利用しても連続的にPCRを効率よく行うことができ、核酸合成酵素の再利用、連続的利用が可能であり、更に増幅したDNAの分離・精製が容易で、スケールアップも可能なDNA増幅装置及びDNA増幅方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

上記目的を達成するため、本発明のDNA増幅装置は、一の流路内を、少なくともテンプレートとなる核酸と、プライマーとなる核酸と、リン酸化合物及び金属イオンを含む反応液を移動させることによりDNAの増幅を行うDNA増幅装置であって、前記流路は、二重鎖を形成した前記テンプレートとなる核酸を変性させて一本鎖にする変性反応を行う変性領域と、一本鎖にした前記テンプレートとなる核酸と前記プライマーとなる核酸とのアニーリング反応を行うと共に核酸合成酵素によってDNA合成反応を行う再生領域とを有し、前記再生領域には核酸合成酵素が固定されていることを特徴とする。

【0013】

本発明のDNA増幅装置によれば、二重鎖を形成したテンプレートとなる核酸を変性させて一本鎖にする変性反応を行う変性領域と、一本鎖にした前記テンプレートとなる核酸とプライマーとなる核酸とのアニーリング反応を行うと共に核酸合成酵素によってDNA合成反応を行う再生領域とを有し、前記再生領域に核酸合成酵素が固定されている一の流路内を、少なくともテンプレートとなる核酸と、プライマーとなる核酸と、リン酸化合物及び金属イオンを含む反応液を移動させることにより、前記核酸合成酵素が、テンプレートとなる核酸を一本鎖に変性させる際の加熱等の影響を受けることがないので、核酸合成酵素の失活を防ぐことができ、耐熱性のない核酸合成酵素を利用しても連続的にPCRを行うことができる。また、前記核酸合成酵素が固定化されているので、増幅したDNAの分離・精製が容易にできると共に前記核酸合成酵素の再利用、連続的利用が可能となり、更に、反応のスケールアップも容易である。なお、本発明において、核酸と言う場合には、天然型及び非天然型の核酸を含む意味である。

【0014】

本発明のDNA増幅装置においては、前記変性領域は加熱手段を備え、前記再生領域は

冷却手段を備えていることが好ましい。

【0015】

この態様によれば、テンプレートとなる核酸を熱変性して一本鎖にする工程、得られた一本鎖のテンプレートとなる核酸に各々相補的なプライマーをアニーリングする工程、核酸合成酵素を作用させて、プライマーから相補鎖合成を行う工程からなる一連のPCRサイクルを連続して効率よく行うことができる。

【0016】

また、前記核酸合成酵素は、前記再生領域内に充填されたビーズに固定されていることが好ましい。

【0017】

この態様によれば、固定化された核酸合成酵素と反応液とを効率よく接触させることができるので反応効率を高めることができる。

【0018】

更に、前記核酸合成酵素は、前記変性領域と再生領域を含む流路の内壁面に固定されていることが好ましい。

【0019】

この態様によれば、核酸合成酵素の固定化した流路を簡単に形成することができる。

【0020】

更にまた、前記流路内に、前記変性領域と前記再生領域が交互に複数設けられていることが好ましい。

【0021】

この態様によれば、PCRサイクルを複数回行うことができるので、目的の核酸を効率よく増幅することができる。

【0022】

更にまた、前記反応液は、少なくとも前記テンプレートとなる核酸を含む第1反応液と、少なくとも前記プライマーとなる核酸と、リン酸化合物及び金属イオンを含む第2反応液とからなり、前記第1反応液を前記流路内に送液する手段と、前記第2反応液を前記流路内に送液する手段とを独立して具備し、前記変性領域及び前記再生領域を通過した反応液を、前記第1反応液として再利用するための流路が設けられていることが好ましい。

【0023】

この態様によれば、テンプレートとなる核酸、プライマーとなる核酸、リン酸化合物等を積極的に再利用することができるので、ランニングコストを低減することができる。

【0024】

また、本発明のDNA増幅方法は、二重鎖を形成した核酸を変性させて一本鎖にする変性反応を行う変性領域と、一本鎖にした前記核酸とプライマーとなる核酸とのアニーリング反応を行うと共に核酸合成酵素によってDNA合成反応を行う再生領域とを有する一の流路に、少なくともテンプレートとなる核酸と、プライマーとなる核酸と、リン酸化合物及び金属イオンを含む反応液を送液し、前記変性領域で、前記テンプレートとなる核酸を一本鎖にする変性反応を行い、次いで、前記再生領域で、一本鎖にした前記テンプレートとなる核酸と前記プライマーとなる核酸とのアニーリング反応を行うと共に該再生領域内に固定された核酸合成酵素によってDNA合成を行うことを特徴とする

【発明の効果】

【0025】

本発明によれば、二重鎖を形成したテンプレートとなる核酸を変性させて一本鎖にする変性反応を行う変性領域と、一本鎖にした前記テンプレートとなる核酸とプライマーとなる核酸とのアニーリング反応を行うと共に核酸合成酵素によってDNA合成反応を行う再生領域とを有する一の流路に、少なくともテンプレートと、プライマーと、リン酸化合物及び金属イオンを含む反応液を送液し、前記変性領域で、前記テンプレートを一本鎖に変性させる変性反応を行い、次いで、前記再生領域で、前記一本鎖にしたテンプレートと前記プライマーとのアニーリング反応を行うと共に該再生領域内に固定された核酸合成酵素

によってDNA合成を行うことにより、前記核酸合成酵素が、テンプレートを変性させる際の加熱等の影響を受けることがないので、核酸合成酵素の失活を防ぐことができ、耐熱性のない核酸合成酵素を利用しても連続的にPCRを行うことができる。また、前記核酸合成酵素が固定化されているので、増幅したDNAの分離・精製が容易にできると共に前記核酸合成酵素の再利用、連続的利用が可能となり、更に、反応のスケールアップも容易にある。

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

まず、本発明のDNAの増幅方法について説明する。

本発明のDNAの増幅方法は、一の流路内に、少なくともテンプレートとなる核酸（以下、単にテンプレートという）と、プライマーとなる核酸（以下、単にプライマーという）と、リン酸化合物及び金属イオンを含む反応液を送液することにより、前記流路内で前記テンプレートの変性、変性させた前記テンプレートと前記プライマーとのアニーリング、核酸合成酵素によるDNAの合成を行うものであり、前記流路には、二重鎖を形成した前記テンプレートとなる核酸を変性させて一本鎖にする変性反応を行う変性領域と、一本鎖にした前記テンプレートとなる核酸と前記プライマーとのアニーリング反応を行うと共に核酸合成酵素によってDNA合成反応を行う再生領域が設けられており、前記再生領域の流路の少なくとも一部には核酸合成酵素が固定化されている。

【0027】

前記変性領域は、テンプレートの変性に必要な環境に設定され、例えば、1) 核酸の解離温度以上に設定する、2) 塩基性・酸性に設定する、3) 陽イオンを含まない、4) 水素結合阻害剤（例えば尿素やグアニジウム塩等）を混入する、等の環境に設定される。なお、テンプレートの変性とは、二重鎖を形成した核酸を解離させて、一本鎖にすることを意味する。

【0028】

本発明では、核酸の変性と再生を繰り返して行うため、上記条件のうち、繰り返し設定が可能な、核酸の解離温度以上に設定する（手段としては加熱が効果的）、あるいは塩基性・酸性に設定することが好ましく、核酸の解離温度以上に設定することが最も効率的であるため特に好ましい。例えば、テンプレートの変性を核酸の解離温度以上に加熱して行う場合は、テンプレートの長さや配列によって異なるため一概には言えないが、例えば、数百merのテンプレートの場合90～99℃、好ましくは92～97℃となるように加熱すればよい。

【0029】

なお、核酸合成酵素に耐塩基性を付与することは困難であるため、従来のPCR法では、テンプレートの変性条件として塩基性環境が用いられることはなかったが、本発明では、核酸合成酵素が固定化された領域を中性環境に設定することにより、変性領域を塩基性環境に設定してテンプレートの変性を行うことも可能である。

【0030】

一方、前記再生領域は、DNA再生に必要な環境に設定され、例えば、1) 核酸の解離温度以下に設定する（手段としては非加熱又は冷却）、2) 弱酸性～弱塩基性に設定する（ $pH 7 \pm 3$ 程度）、3) 適当な陽イオンを含む、4) 水素結合阻害剤（例えば尿素やグアニジウム塩等）を含まない、等の条件をすべて満たす環境に設定される。例えば、DNA再生を行う際の温度条件は、テンプレートとプライマーとの解離温度によって異なるため一概には言えないが、例えば、15～30merのプライマーを用いた場合、30～70℃であり、本発明においては30～40℃が特に好ましい。なお、DNA再生とは、お互いに相補的な一本鎖のDNA同士、又はRNAとDNAが二重鎖を形成することであり、PCRを行う環境下におけるDNA再生とは実質的にテンプレートとプライマーとのアニーリングを意味する。

【0031】

本発明においては、前記変性領域は、流路内を移動する反応液を上記の核酸の解離温度

以上に加熱できるように、該流路の外部に加熱手段を設けることによって形成することが好ましく、前記再生領域は、流路内を移動する反応液を上記の核酸の解離温度以下に冷却できるように、該流路の外部に冷却手段を設けることによって形成することが好ましい。

#### 【0032】

本発明の方法で使用される核酸合成酵素は、DNA増幅に使用できる酵素であって、一般に入手可能な酵素であれば特に制限なく用いることができ、具体的には、DNAポリメラーゼ、リガーゼ、逆転写酵素等が例示できる。また、これらの核酸合成酵素とRNAポリメラーゼを組み合わせて用いることもできる。

#### 【0033】

なお、本発明においては、従来のPCR法やリガーゼ連鎖反応（ligase chain reaction: LCR）法で使用されている耐熱性を有する核酸合成酵素を用いることもできるが、核酸合成酵素が前記再生領域の流路内に固定化されており、テンプレートを変性させる際に行われる加熱等に曝されないので、耐熱性のない核酸合成酵素を用いることができる。

#### 【0034】

本発明においては、反応効率の高い酵素や入手しやすい酵素が好ましく用いられ、具体的には、複製の信頼性の高い大腸菌由来のDNAポリメラーゼIが好ましく用いられる。また、若干複製の信頼性が低くなるがDNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ活性部位を除いたクレノーフラグメント等を用いることもできる。

#### 【0035】

前記核酸合成酵素は、例えば、ビーズ表面に固定化して前記再生領域の流路の少なくとも一部に充填してもよく、流路の内壁面に直接固定化してもよい。

#### 【0036】

核酸合成酵素を固定化するビーズの材質は特に限定されないが、金属微粒子、ガラス粒子、樹脂製粒子等が好ましく例示でき、特にラテックスビーズのように生体分子との相性が良く、酵素の固定化が容易なビーズが好ましく用いられる。前記ビーズの大きさは、前記流路内に充填可能な大きさであればよく、適宜設定できるが、通常、直径0.4～100μm、好ましくは直径1～50μmである。

#### 【0037】

また、前記流路は、熱伝導性が比較的高く、PCRに必要な温度範囲において安定で、電解質溶液や有機溶媒に浸食されにくく、核酸やタンパク質を吸着しにくい材質で形成されていることが好ましい。耐熱性や耐食性を有する材質としては、ガラス、石英、シリコンの他、各種プラスチックが例示できるが、さらにそれらの表面（反応液と接触する内壁面）を、ポリエチレン、ポリプロピレン等の一般的に核酸やタンパク質を吸着しにくいと言われる材質で被覆したり、ポリエチレングリコール（PEG）等の親水性の官能基を多く含む分子を共有結合等で導入し、核酸やタンパク質の吸着を抑制することが好ましい。

#### 【0038】

前記ビーズ表面、あるいは流路の内壁面に核酸合成酵素を固定化する方法としては、担持法や包含法、共有結合法、架橋法、静電吸着法等の公知の方法を採用することができるが、酵素反応を繰り返し行うためには共有結合法や架橋法が特に好ましい。例えば、共有結合法は、特開平3-164177号公報等に記載された方法にしたがって行うことができ、ビーズ表面や流路の内壁面に比較的反応性の高い官能基（例えば、クロロカルボニル基（カルボン酸塩化物）、カルボキシ基、アミノ基、チオール基（スルファニル基）、エポキシ基等）を導入し、該官能基と核酸合成酵素の表面にあるカルボニル基やアミノ基、チオール基（スルファニル基）と反応させることにより固定化することができる。

#### 【0039】

本発明で使用される反応液には、少なくともテンプレートと、プライマーと、リン酸化化合物及び金属イオンが含まれる。

#### 【0040】

前記テンプレートは、増幅の目的となる核酸であり、常法によって調製された天然型あるいは非天然型の核酸を用いることができる。反応液中における前記テンプレートの濃度



は、通常、0.01~100 pMが好ましく、0.1~10 pMがより好ましい。

【0041】

前記プライマーは、前記テンプレートの少なくとも一部の塩基配列と相補的な塩基配列を有する核酸であり、一般的なPCR法やLCR法において使用できるものであればよいが、目的とする核酸を効率よく増幅できるように設計されることが好ましく、通常、15~30merのものが好ましく用いられる。例えば、プライマーとなるDNAは、DNA自動合成機を用いることにより容易に作製することができる。反応液中における前記プライマーの濃度は、通常、0.01~1  $\mu$ Mが好ましく、0.1~0.2  $\mu$ Mがより好ましい。また、前記プライマーには、後の検出や分離のために化学的に修飾・改変された非天然型核酸も含まれる。前記非天然型核酸は、特に限定されないが、ビオチンやFITCで標識されたオリゴ核酸、ホスホチオエート結合を有するオリゴ核酸やPNA（ペプチド核酸）と天然型核酸とを含有するキメラ核酸等が好ましく例示できる。

【0042】

前記リン酸化合物は、核酸を増幅する際の基質となる成分であり、例えば、核酸合成酵素としてDNAポリメラーゼや逆転写酵素を使用する場合には、dNTP、すなわちdATP、dCTP、dGTP及びdTTPを任意の割合で含む混合物、好ましくは4種類のデオキシヌクレオチド3リン酸の等量混合物が用いられる。一方、リガーゼを使用する場合は、NTPを使用することが好ましく、特にATPやGTPが好ましく例示できる。反応液中における前記リン酸化合物の濃度は、適宜設定することができるが、通常、0.01~1 mMが好ましく、0.1~0.5 mMがより好ましい。

【0043】

前記金属イオンとしては、カリウムイオン ( $K^+$ )、ナトリウムイオン ( $Na^+$ )、マグネシウムイオン ( $Mg^{2+}$ ) 等が例示できる。このような金属イオンを含むことにより、二重鎖DNAの安定化、酵素活性化、合成されたDNAの忠実性向上等の効果を得ることができる。反応液中における前記金属イオンの濃度は、通常、カリウムイオンやナトリウムイオンは10~200 mMが好ましく、50~100 mMがより好ましい。また、マグネシウムイオンは1~5 mMが好ましく、1.5~2.5 mMがより好ましい。

【0044】

本発明の方法においては、流路内でテンプレートの変性、変性させたテンプレートとプライマーとのアニーリング、及びDNA合成を効率よく行うことができるように、前記反応液の送液速度や流路の長さ等の条件を適宜調整することが好ましい。これらの条件は、テンプレートの長さや合成するDNAの長さ、用いる核酸合成酵素の反応速度等によって影響を受けるため一概には言えないが、通常、前記反応液が、前記変性領域を1回通過する際の時間は1~60秒、好ましくは5~30秒であり、前記再生領域を1回通過する際の時間は5~300秒、好ましくは10~120秒である。

【0045】

以下、本発明のDNAの増幅方法に用いられるDNA増幅装置を図面に基づいて説明するが、基本的に同一の部分には同じ符号を付してその説明を省略する。

【0046】

図1には、本発明のDNA増幅装置の一実施形態が示されている。DNA増幅装置10は、加熱領域と冷却領域を有する基板1に、前記加熱領域と前記冷却領域を交互に蛇行して、前記加熱領域と前記冷却領域をそれぞれ複数回通過するように所定の内径を有する流路1が形成されており、前記冷却領域に形成された流路2の一部には、表面に核酸合成酵素が固定化されたビーズが充填されているビーズ充填部3が複数個所設けられている。また、前記流路2の両端には、該流路内に反応液を注入するための注入孔2aと、DNAの増幅反応が終了した反応液を取り出すための取り出し孔2bが設けられている。

【0047】

また、図2には、前記DNA増幅装置の流路の一部を拡大した模式図が示されており、前記ビーズ充填部3には、核酸合成酵素5がビーズ4の表面に固定化された固定化核酸合成酵素6が充填され、流路を移動してきた反応液と核酸合成酵素5が接触できるようにな

っている。このビーズ充填部 3 は、冷却領域のすぐ下流に形成することもできる。なお、固定化核酸合成酵素 6 を流路内に充填する場合、該固定化核酸合成酵素 6 が漏れないようにビーズ充填部 3 の下流に適当な篩いサイズを有するフィルターを設置することが好ましい。フィルターの材質としては、特に限定されないが、核酸の吸着を起こさないものが好ましく、セルロースなどが好ましく例示できる。

#### 【0048】

この DNA 増幅装置 10 によれば、図示しないポンプ等の外部送液装置により、流路 2 内を図中矢印の方向に送液された少なくともテンプレートと、プライマーと、リン酸化合物及び金属イオンを含む反応液は、まず、前記加熱領域で前記テンプレートが熱変性により一本鎖にされた後、前記冷却領域で前記一本鎖のテンプレートと、該テンプレートに相補的なプライマーとのアニーリング反応が行われ、更に前記ビーズ充填部 3 で固定化核酸合成酵素 6 により前記一本鎖のテンプレートの相補鎖の合成が行われ、前記加熱領域と前記冷却領域をそれぞれ 1 回通過する毎に 1 サイクルの PCR が行われるようになっている。

#### 【0049】

本発明において、前記流路 2 は、前記加熱領域と前記冷却領域をそれぞれ 1 回以上通過するように形成されていればよいが、DNA 増幅を効率よく行うためには、20～40 回通過するように形成されていることが好ましい。

#### 【0050】

また、前記流路 2 の大きさは、流径を小さくして比表面積を大きくすることにより熱伝導を行いやすくして熱揺らぎが生じないようにすることが好ましい (Science (1998 年) 280 号 5366 巻、1046-1048 頁 (Kopp MU、Mello AJ、Manz A. 著) 参照)。具体的には、流路の幅は 20～200  $\mu\text{m}$ 、好ましくは 50～100  $\mu\text{m}$  であり、深さは 20～200  $\mu\text{m}$ 、好ましくは 40～100  $\mu\text{m}$  である。また、固定化核酸合成酵素 6 を充填する部分の流路の幅は 20～3000  $\mu\text{m}$ 、好ましくは 50～1000  $\mu\text{m}$  であり、深さは 20～1000  $\mu\text{m}$ 、好ましくは 40～500  $\mu\text{m}$  である。

#### 【0051】

前記流路 2 は、熱伝導性が比較的高く、PCR に必要な温度範囲において安定で、電解質溶液や有機溶媒に浸食されにくく、核酸やタンパク質を吸着しにくい材質で形成されていることが好ましい。例えば、耐熱性や耐食性を有する材質としては、ガラス、石英、シリコンの他、各種プラスチックが例示できるが、さらにそれらの表面 (反応液と接触する面) を、ポリエチレン、ポリプロピレン等の一般的に核酸やタンパク質を吸着しにくいと言われる材質で被覆したり、ポリエチレングリコール (PEG) 等の親水性の官能基を多く含む分子を共有結合等で導入し、核酸やタンパク質の吸着を抑制することが好ましい。

#### 【0052】

前記流路を有する基板は、例えば、以下のようにして形成することができる。すなわち、上記の材質からなる 1 枚の基板上に、上記所定の幅と深さを有する溝を切削加工等により形成し、前記溝に蓋をするように、もう 1 枚の基板やフィルムを貼り付ければよい。

#### 【0053】

図 3 には、本発明の DNA 増幅装置の別の実施形態が示されている。この DNA 増幅装置 20 は、図 1 に示した基板 1 が、枝分かれ状に複数接続されたものである。なお、基板 1 の接続形態は、図 3 に示す形態に限定されるものではなく、DNA 増幅を効率よく行うことができるように様々な形態で接続することができる。

#### 【0054】

DNA 増幅装置 20 は、少なくとも前記テンプレートを含む第 1 反応液と、少なくとも前記プライマーと、リン酸化合物及び金属イオンを含む第 2 反応液からなる反応液を用い、ポンプ等の外部送液装置 11 より、まず、基板 1a に前記第 1 反応液と前記第 2 反応液が供給されるようになっており、基板 1b～1g には、前記基板 1a を通過した反応液が外部送液装置 12 によりそのままテンプレートとして供給されると共に、前記基板 1a での反応で消費されたプライマーやリン酸化合物等の反応基質を補充するために、前記第 2

反応液が供給されるようになっている。

【0055】

そして、前記基板1b～1fを通過した反応液は、そのまま回収してDNAの精製を行ってもよく、必要に応じて更に複数の基板へ接続してDNA増幅を行ってもよい。

【0056】

なお、本実施形態においては、前記基板1aを通過した反応液の一部、及び前記基板1gを通過した反応液を、前記第1反応液として再利用するための流路7、8とポンプ13が設けられている。このような流路を設けることにより、テンプレートの枯渇を防ぐことができ、連続したDNA増幅を安定して行うことができると共にランニングコストの低減を図ることができる。

【0057】

なお、このように枝分かれ状に基板を接続した場合は、各段の少なくとも一つの基板、例えば、枝分かれする直前の基板（基板1a）や、基板を通過した反応液を第1反応液として再利用する経路を有する基板（基板1g）には、複製の信頼性の高い核酸合成酵素が固定化されていることが好ましい。これにより、テンプレートの増幅を正確に行うことができるので、PCRを繰り返し行っても正確にテンプレートを増幅することができる。

【0058】

本発明のDNA増幅装置において、前記加熱領域及び前記冷却領域は、例えば、図4（a）に示すように、加熱手段34を有する恒温槽31と冷却手段35を有する恒温槽32とが仕切り板38で仕切られた構造を有する温度制御装置33内に基板1を設置することにより形成することができる。なお、前記各恒温槽には、恒温槽内の媒体を攪拌し、温度を均一に保つために攪拌機36及び37がそれぞれ設置されている。

【0059】

また、図4（b）に示すように、複数の基板1を積層し、各基板の間あるいは数枚毎の基板間に、加熱手段39と冷却手段40とを配置して、前記加熱領域及び冷却領域を形成してもよい。

【0060】

なお、前記加熱手段及び前記冷却手段は、任意の温度制御装置により温度を一定に保つことができればよく、具体的には熱電素子や恒温装置等が好ましく例示できる。

【0061】

図5には、本発明のDNA増幅装置の更に別の実施形態が示されている。このDNA増幅装置50は、流路として2本のキャピラリー51が用いられており、キャピラリー51は、加熱領域と冷却領域を交互に通過するように、螺旋状に巻かれて、加熱領域と冷却領域とを有する温度制御装置52内に設置されている。

【0062】

前記キャピラリー51の内壁面には、図6に示すように核酸合成酵素4が直接固定化されている。

【0063】

前記キャピラリーの材質は特に制限されないが、熱伝導性が比較的高く、PCRに必要な温度範囲において安定で、電解質溶液や有機溶媒に浸食されにくく、核酸やタンパク質を吸着しにくい材質で形成されていることが好ましく、例えば、ガラス、プラスチック等が例示できるが、さらにそれらの表面（反応液と接触する面）を、ポリエチレン、ポリプロピレン等の一般的に核酸やタンパク質を吸着しにくいと言われる材質で被覆したり、ポリエチレングリコール（PEG）等の親水性の官能基を多く含む分子を共有結合等で導入し、核酸やタンパク質の吸着を抑制することが好ましい。

【0064】

また、半透性で高分子を通過させず低分子のみを透過するような性質を有する素材からなるキャピラリーを用いることもでき、その場合は、該キャピラリーを設置する恒温槽の媒体として、低分子量の基質（例えばdNTPやNTP等）を含む溶液を用いることによって、キャピラリー内に常に反応基質を供給することも可能となる。半透性のキャピラリ

ーとしては、三菱レーヨンや東レ等から発売されている中空糸が好ましく例示できる。

【0065】

本発明において、前記キャピラリーのサイズは、外径が100～1000 $\mu$ m、好ましくは200～500 $\mu$ mであり、内径が20～600 $\mu$ m、好ましくは50～150 $\mu$ mである。

【0066】

前記キャピラリーの内壁面への核酸合成酵素の固定化は、上述した核酸合成酵素を固定化する方法と同様の方法で行うことができ、キャピラリーの全内壁面に核酸合成酵素を固定化すればよい。これにより、ビーズを装填したり、特定の場所にだけ核酸合成酵素を固定化したりする手間を省くことができる。なお、キャピラリーの全内壁面に核酸合成酵素を固定化した場合、変性領域に固定化された核酸合成酵素は加熱等により失活する可能性が高くなるが、再生領域に固定化された核酸合成酵素は失活することがないので実用上の問題はない。

【産業上の利用可能性】

【0067】

PCR法によって、例えば微量のテンプレートDNA等を効率的に複製・増幅するのに利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1】 本発明のDNA増幅装置の一実施形態を示す図である。

【図2】 前記DNA増幅装置の流路の一部の模式図である。

【図3】 本発明のDNA増幅装置の別の実施形態を示す図である。

【図4】 前記加熱領域及び冷却領域を形成するための加熱手段及び冷却手段の説明図である。

【図5】 本発明のDNA増幅装置の更に別の実施形態を示す図である。

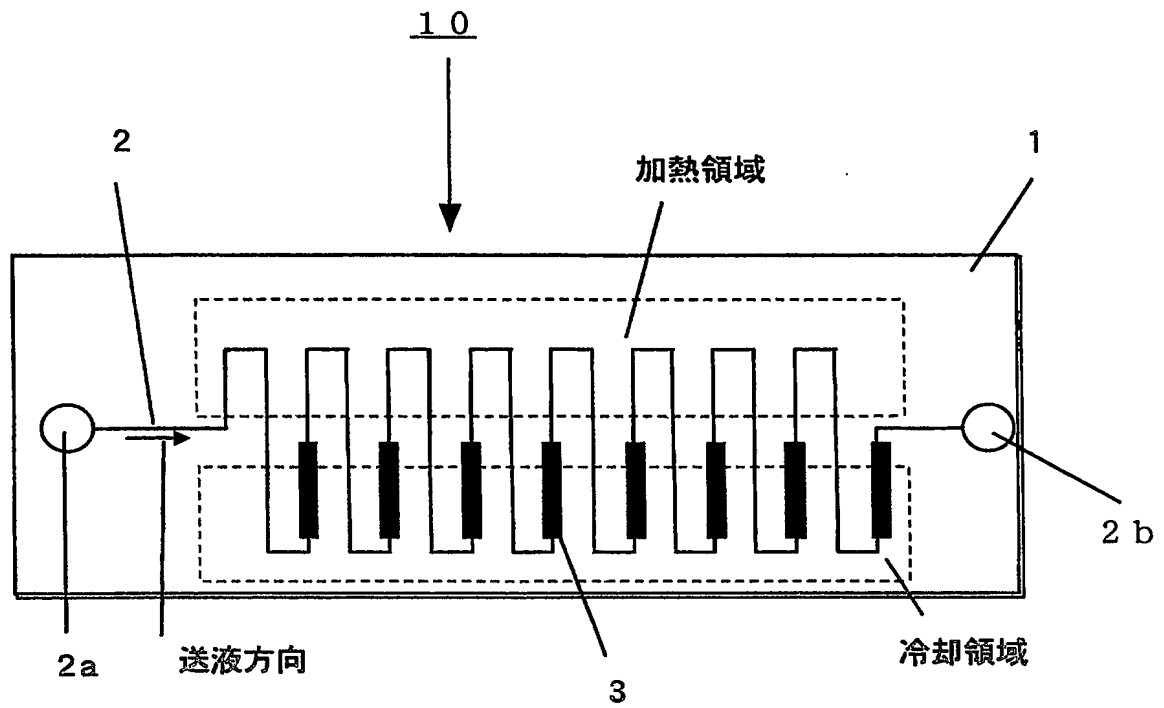
【図6】 キャピラリー内に固定化された核酸合成酵素を示す模式図である。

【符号の説明】

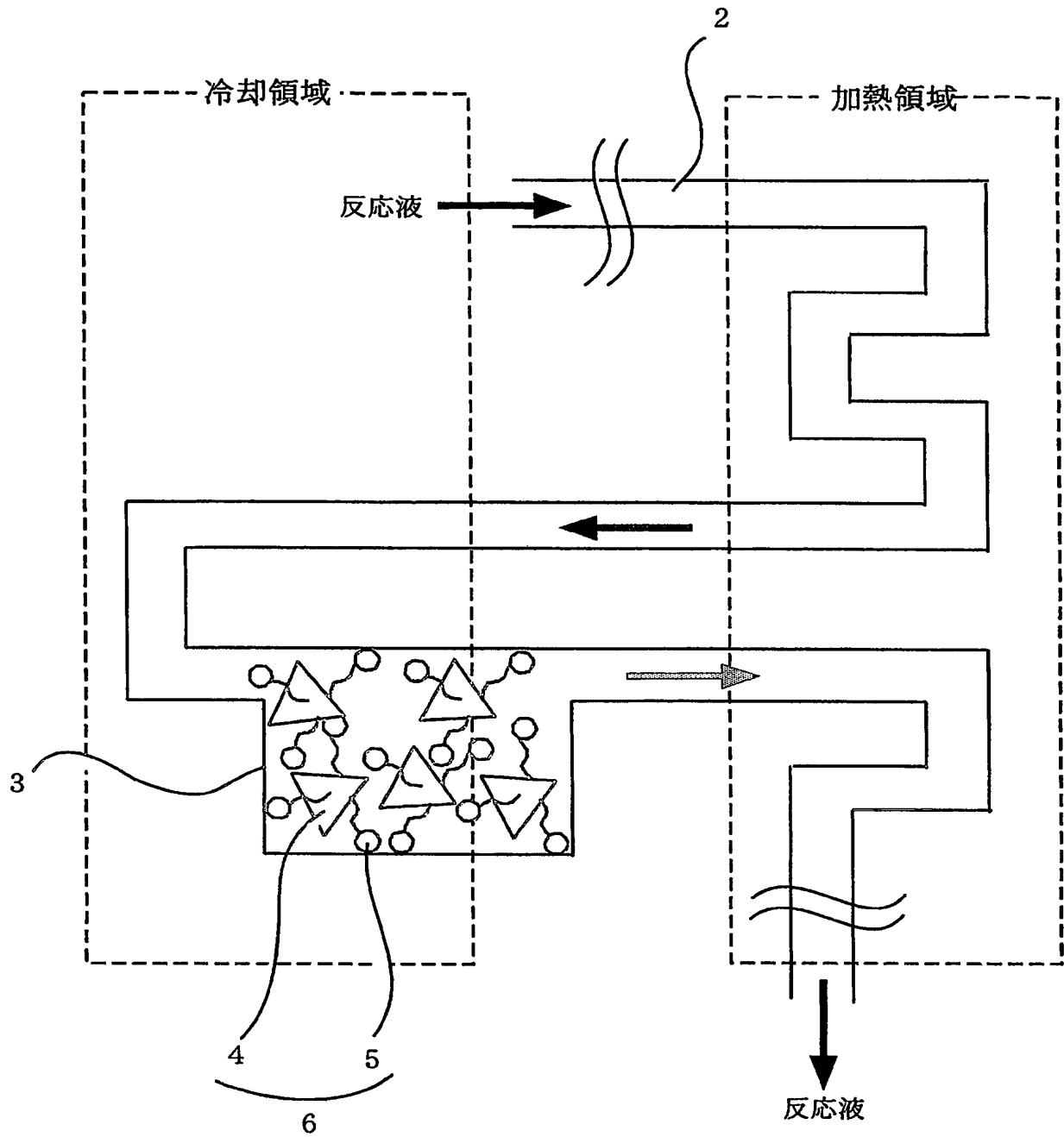
【0069】

- 1、1a～1g. 基板
2. 流路
- 2a. 注入孔
- 2b. 取り出し孔
3. ビーズ充填部
4. ビーズ
5. 核酸合成酵素
6. 固定化核酸合成酵素
- 10、20、50. DNA増幅装置
- 11～13. 外部送液装置
- 31、32. 恒温槽
- 33、52. 温度制御装置
- 34、39. 加熱手段
- 35、40. 冷却手段
51. キャピラリー

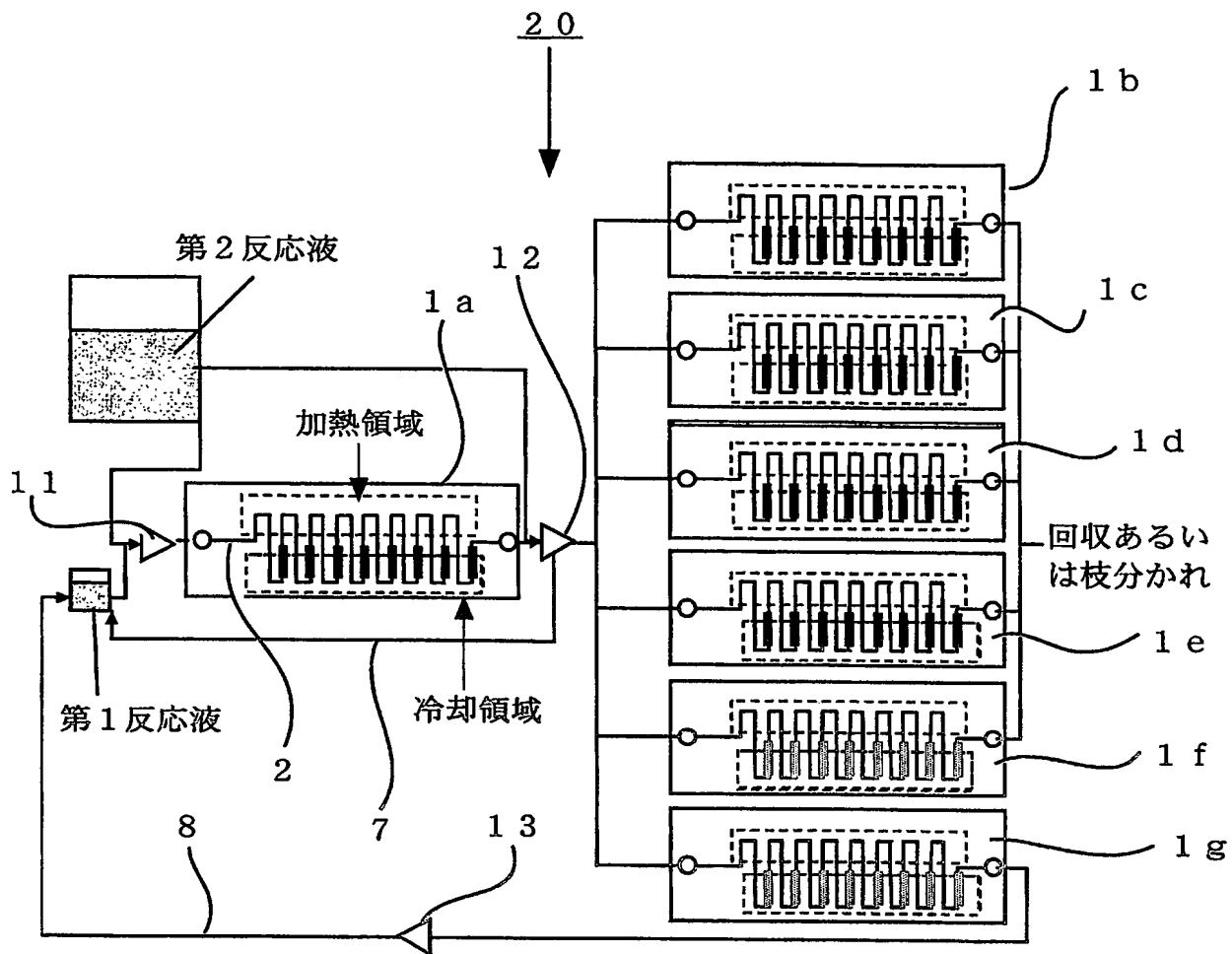
【書類名】 図面  
【図 1】



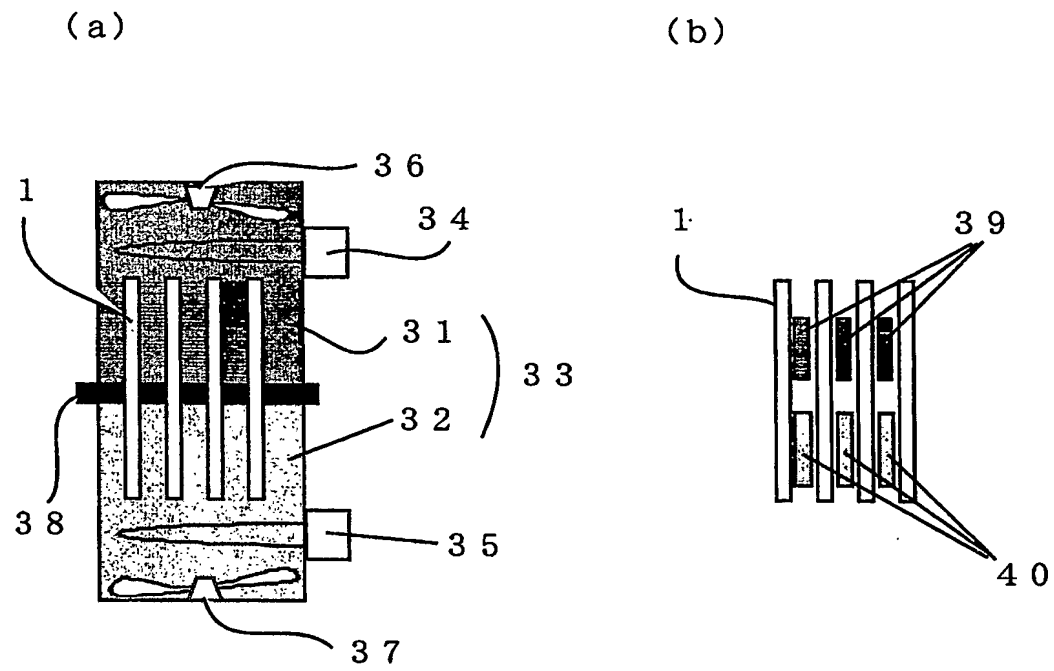
【図 2】



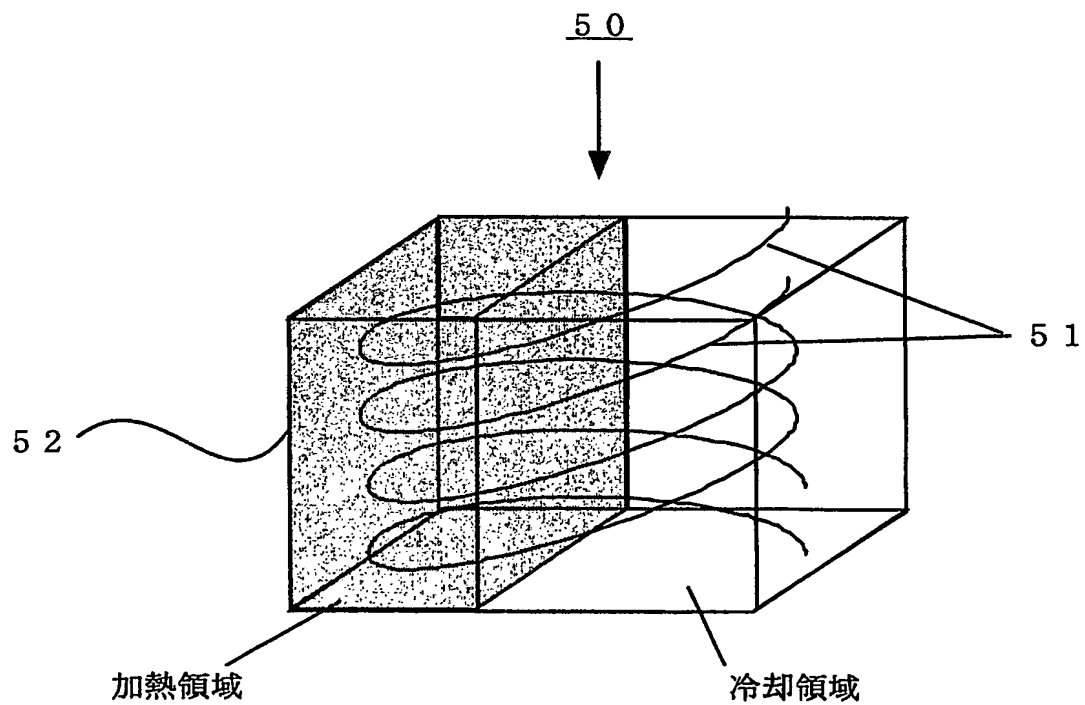
【図 3】



【図 4】

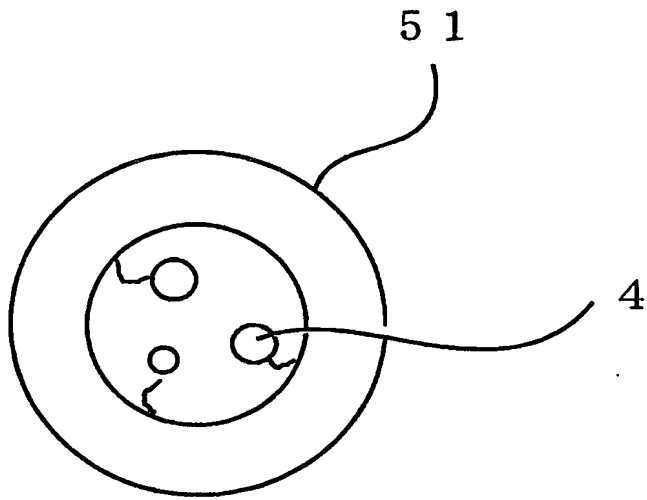


【図 5】





【図 6】



**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** 耐熱性のない核酸合成酵素を利用してもPCRを効率よく行うことができ、核酸合成酵素の再利用やスケールアップ等が可能で、増幅したDNAの分離・精製も容易なDNA増幅装置及びDNA増幅方法を提供する。

**【解決手段】** 二重鎖を形成したテンプレートとなる核酸を変性させて一本鎖にする変性反応を行う変性領域と、一本鎖にした前記テンプレートとなる核酸とプライマーとなる核酸とのアニーリング反応を行うと共に核酸合成酵素によってDNA合成反応を行う再生領域とを有する一の流路に、少なくともテンプレートとなる核酸と、プライマーとなる核酸と、リン酸化合物及び金属イオンを含む反応液を送液し、前記変性領域で前記テンプレートを一本鎖に変性させた後、前記再生領域で一本鎖にした前記テンプレートと前記プライマーとなる核酸とのアニーリング反応を行うと共に該再生領域内に固定された核酸合成酵素によってDNA合成を行う。

**【選択図】** 図1

特願 2 0 0 3 - 2 7 3 4 3 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 2 0 4 2 8 4 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都台東区上野 6 丁目 1 6 番 2 0 号

氏 名

太陽誘電株式会社